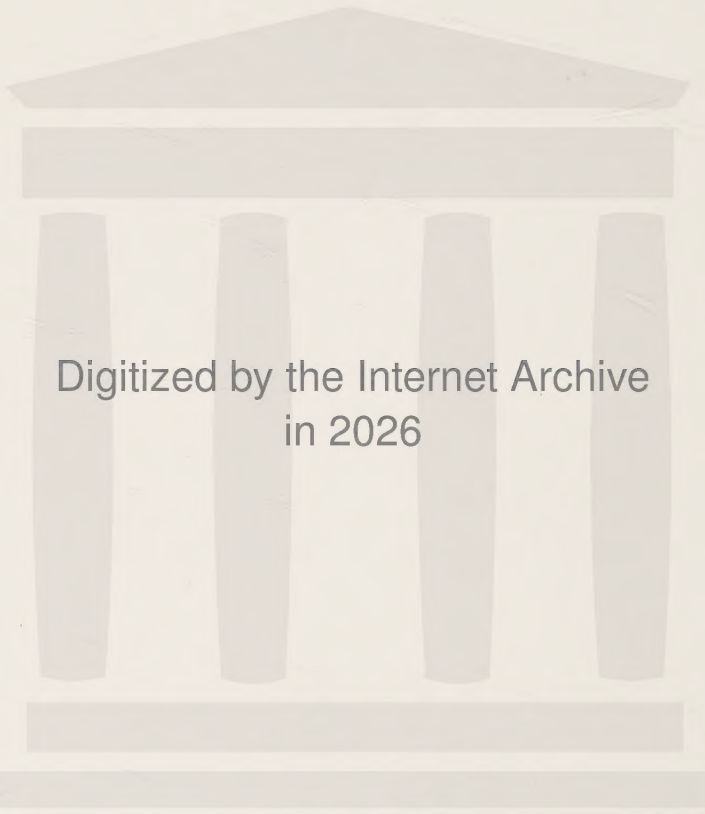


**DIE HISTIDASEAKTIVITÄT IM NAGELBETT
VON 24 HISTIDINÄMIEFAMILIEN UND
STUDIEN ZUR ENZYMKINETIK**

ELISABETH MALLY

1984

*Diss München
1985*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554826_0081

Aus der Dr. v. Haunerschen Kinderklinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. H.-B. Hadorn

DIE HISTIDASEAKTIVITÄT IM NAGELBETT

VON 24 HISTIDINÄMIEFAMILIEN UND

STUDIEN ZUR ENZYMKINETIK

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Elisabeth Mally

aus

Neumarkt/Opf

Jahr 1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. W. Endres

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H.B. Hadorn

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 09. April 1985

Ich möchte mich bei allen Personen bedanken, die bei der Entstehung dieser Arbeit behilflich waren. Mein besonders herzlicher Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. Endres, Frau Dr. Y. Shin, Herrn M. Rieth, Frau A. Stolla sowie allen Mitarbeitern des Stoffwechsellabors der Dr. v. Haunerschen Kinderklinik/München.

Äbenso herzlichen Dank an Frau Dr. Scheibenreiter und Herrn Professor Thalhammer/Universität Wien für die Bereitstellung des Probenmaterials.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

I.	Einleitung	1
II.	Materialien und Methoden	10
	1. Materialien	10
	2. Methoden	10
	a) Versuch	10
	b) Prinzip der Enzymkinetik	13
III.	Patienten	16
IV.	Ergebnisse	18
	1. Serumhistidin und Urocaninsäurespiegel der untersuchten Patienten	18
	2. Histidaseaktivitäten der 24 untersuchten Familien	22
	3. Stammbäume der untersuchten Familien mit Histidinämie	33
	4. Vergleiche zwischen Serumhistidinspiegeln und Serumhistidaseaktivitäten	38
	5. Ergebnisse der Studie zur Enzymkinetik	40

V.	Diskussion	46
1.	Histidaseaktivitäten der 24 untersuchten Familien und Charakterisierung der Zwischengruppe	46
2.	Serumhistidinspiegel in Abhängigkeit von den Histidaseaktivitäten	49
3.	Enzymkinetik	50
4.	Diätbehandlung bei Histidinämie	51
VI.	Inhaltsangabe	53
	Literaturverzeichnis	56

I. Einleitung

Histidin ist eine Aminosäure mit einem schwach basischen Imidazolring. Während der Fetalzeit und im Kleinkindalter ist diese Aminosäure essentiell. Zu den verschiedenen Stoffwechselwegen, über die Histidin metabolisiert wird, gehören die Umwandlung zu Urocaninsäure und Formiminoglutaminsäure, die Decarboxylierung zu Histamin, die Transaminierung und oxydative Desaminierung und die Mitwirkung an der Bildung der Dipeptide Carnosin, Homocarnosin und Anserin.

Die größte Bedeutung sowohl im menschlichen als auch im tierischen Organismus nimmt hierbei die durch die Histidin-Ammoniak-Lyase (=Histidase oder Histidindesaminase) katalysierte Umwandlung zu Urocaninsäure ein. Dies ist ein irreversibler Stoffwechselschritt (16). Histidin wird dabei unter Einführung einer Doppelbindung desaminiert. Da das Folgeprodukt Urocaninsäure im Gegensatz zu Histidin eine NH_3 -Gruppe weniger besitzt, zeigen die beiden Substanzen unterschiedliche Ladungseigenschaften.

Urocaninsäure wurde 1874 von Jaffe im Hundeharn entdeckt und konnte nach Histidingabe im tierischen Urin experimentell nachgewiesen werden. Durch Anlagerung von Wasser wird Urocaninsäure mit Hilfe des Enzyms Urocanase zu Imidazolonpropionsäure weitermetabolisiert. Imidazolonpropionsäure, eine instabile Verbindung, wird zu einem kleinen Teil durch nicht-enzymatische Oxydation zu 4-Ketoglutaraminsäure weiterverwandelt. Weitere Nebenwege im Metabolismus von Imidazolonpropionsäure sind die nicht-enzymatische Hydrolyse zu Formiminoglutamin und die Oxydation zu Hydantoinpropionsäure. Aus dem größten Teil entsteht jedoch die durch Imidazolonpropionsäurehydroxylase katalysierte Formiminoglutaminsäure. Die Formiminogruppe wird als "aktives Formiat" auf Tetrahydrofolsäure übertragen. Verschiedene Studien an Ratten, bei denen durch

eine spezielle Ernährung ein Folsäuremangel erzeugt wurde, zeigten, daß hier die Abbaurate von Histidin wesentlich geringer war als bei Ratten, die keinen Folsäuremangel hatten (27). Andererseits besteht bei Tieren mit Folsäuremangel eine erhöhte Ausscheidung von Formiminoglutaminsäure im Urin. Mit einem Gemisch aus verschiedenen Enzymen, das aus Säugetierleber isoliert werden kann, ist es möglich, die Bildung von N¹⁰-Formyltetrahydrofolsäure, Glutaminsäure und Ammoniak aus Formiminoglutaminsäure und Tetrahydrofolsäure nachzuvollziehen (16).

Ein Defekt im oben beschriebenen Stoffwechselweg des Histidins (Abb.1), welcher der Stoffwechselkrankheit Histidinämie zugrunde liegt und biochemisch als Histidasemangel in Erscheinung tritt, soll in der vorliegenden Arbeit näher untersucht werden.

Ein weiterer Stoffwechselweg des Histidins ist seine Umwandlung zu Histamin. Das hierzu nötige Enzym heißt Histidindecaboxylase. Sie wurde in tierischen und pflanzlichen Geweben sowie in Bakterien gefunden. Besonders hohe Histaminkonzentrationen finden sich in den Mastzellen. Es liegt dort in der inaktiven, gebundenen Form vor und wird bei Bedarf freigesetzt. Seine wichtigsten Wirkungen sind die Erweiterung der Blutkapillaren, Arteriolen und Venolen und Erhöhung ihrer Permeabilität, die Steigerung der Magensaft- und Drüsensekretion sowie die Erregung der glatten Muskulatur und Konstriktion der Bronchiolen. Über derartige Mechanismen kann Histamin zu Blutdrucksenkungen und allergischen Reaktionen führen. Histamin wird durch die Aminoxydase Histaminase unter Bildung der instabilen Iminogruppe als Zwischenprodukt und deren Hydroxylase zu Imidazolacetaldehyd und Ammoniak abgebaut und somit inaktiviert (Abb.2). Der Wasserstoff wird auf molekularen Sauerstoff übertragen, wobei Wasserstoffperoxyd entsteht. Der Imidazolacetaldehyd wird durch die Enzyme Xanthinoxydase oder Acetaldehyddehydrogenase in Gegenwart von NAD zu Imida-

zolelessigsäure weitermetabolisiert (16).

Ein weiterer Nebenweg des Histaminmetabolismus führt zu Methylhistamin. Das Enzym Imidazol-N-Methyltransferase katalysiert die Übertragung der Methylgruppen von S-Adenosylmethionin auf das Stickstoffatom des Imidazolringes.

Neben dem Abbau zu Urocaninsäure und der Bildung von Histamin wird Histidin durch Transaminierung oder oxydative Desaminierung zu Imidazolpyruvat umgewandelt, welches durch oxydative Decarboxylierung zu Imidazolelessigsäure weitermetabolisiert wird. Außerdem ist Histidin an der Bildung der Dipeptide Carnosin (= β -Alanylhistidin), Homocarnosin und Anserin beteiligt, die vor allem im Muskelgewebe vorkommen. Ihre Funktion ist noch nicht ganz geklärt. Man vermutet einen Zusammenhang mit dem Vitamin-E-Stoffwechsel. So fand man im Skelettmuskel von Kaninchen mit Vitamin-E-Mangel erniedrigte Konzentrationen von Carnosin und Anserin und eine erhöhte Ausscheidung von Methylhistidin im Urin. Die Bildung von Carnosin und Anserin ist bei Vitamin-E-Mangel erheblich herabgesetzt. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, daß die durch Vitamin-E-Mangel verursachte Muskeldystrophie mit einer verminderten Bildung von Anserin kombiniert ist (16).

Histidin kann weiterhin in sein Trimethylammoniumderivat, das Hercynin, übergeführt werden, das in Pilzen vorkommt. Aus dem Mutterkorn hat man das Ergothionein isoliert, das aus dem Hercynin durch Einführung einer Sulfhydrylgruppe in Stellung 2 des Imidazolringes entsteht. Ergothionein kommt in den Erythrozyten vor; es ist aber alimentären Ursprungs.

Eine Zusammenfassung der oben beschriebenen Stoffwechselwege des Histidin ist zur besseren Übersicht in Abbildung 3 nochmals schematisch dargestellt.

Histidinämie ist eine Stoffwechselkrankheit, bei der das Enzym Histidase fehlt (3,13,20,26). Ihre Häufigkeit in der Normalbevölkerung beträgt international 1:16740 (22).

Durch den Histidasemangel kommt es zu einer Anhäufung von Histidin im Blut und im Urin (1,5,9).

Bei einem bestimmten Prozentsatz der Fälle führt dies zu einer leichten Hirnschädigung und einer verzögerten Sprachentwicklung (11).

Popkin et al. (18) analysierten frühere Veröffentlichungen und fanden an Hand der darin beschriebenen Fälle heraus, daß das Risiko einer geistigen Retardierung oder Verzögerung der Sprachentwicklung bei unbehandelten Histidinämiepatienten etwa 40 % betrug. Der Grund, weshalb Histidinämie bei einem Teil der Patienten klinische Erscheinungen hervorruft und bei einem weiteren Teil völlig inapparent verläuft, ist noch nicht geklärt. Neville et al. konnten keine biochemischen Unterschiede feststellen zwischen Histidinämiekindern mit normaler Intelligenz und solchen, die zurückgeblieben waren (17). Lyon et al. (14) und Kacser et al. (4) berichteten, daß Histidinämie bei Müttern eine mögliche Ursache für ZNS-Veränderungen ihrer Kinder sein könnte.

Kuroda et al. (9) unterteilten Histidinämiepatienten mit Hilfe einer Radioaktivitätsmethode zur Histidasemessung in zwei Gruppen: Die erste Gruppe enthielt Patienten, deren Histidaseaktivität weniger als 10 % der Normalwerte betrug, die zweite Gruppe bestand aus Patienten mit weniger als 20 % Histidaseaktivität. Die beiden Gruppen unterschieden sich auch in ihren Serumhistidinkonzentrationen vor Verabreichung einer histidinarmen Diät und zeigten eine unterschiedliche Zunahme der Serumhistidinkonzentrationen nach Histidinaufnahme (bei Gruppe 1 stieg die Histidinkonzentration mehr an als bei Gruppe 2).

Die Histidaseaktivität ist am höchsten in der Leber und in der Epidermis (8,27). Urocaninsäure wurde auch im Schweiß gefunden und man glaubt, daß diese Substanz eine Schutzfunktion gegen UV-Strahlen besitzt (16).

Um Histidinämiepatienten besser untersuchen zu können, wurde ein einfach durchzuführender Enzymtest entwickelt, mit dem eine große Zahl von Untersuchungen gemacht werden kann. Es handelt sich dabei um eine Radioaktivitätsmethode, mit der das Enzym Histidase der Eponychialhaut gemessen werden kann (24,19). Unter Verwendung dieser Methode, die im folgenden Teil kurz beschrieben wird, soll in der vorliegenden Arbeit die Histidaseaktivität von insgesamt 24 Familien mit erkrankten Kindern bestimmt werden.

Ziel dieser Messungen ist es, die an Hand von Dünnschichtchromatographie, Guthrietest, Histidinbelastung und Bestimmung der Urocaninsäure der Haut, gestellten Diagnosen durch Histidasebestimmung nochmals zu überprüfen. Weiterhin soll durch Messung der Histidaseaktivität bei Eltern und Geschwistern erkrankter Kinder der autosomal-rezessive Erbgang der Histidinämie dargestellt werden.

An 4 dieser Familien soll eine Studie zur Enzymkinetik durchgeführt werden, mit dem Ziel, die Unterschiede zwischen Homozygoten, Heterozygoten und Gesunden herauszuarbeiten.

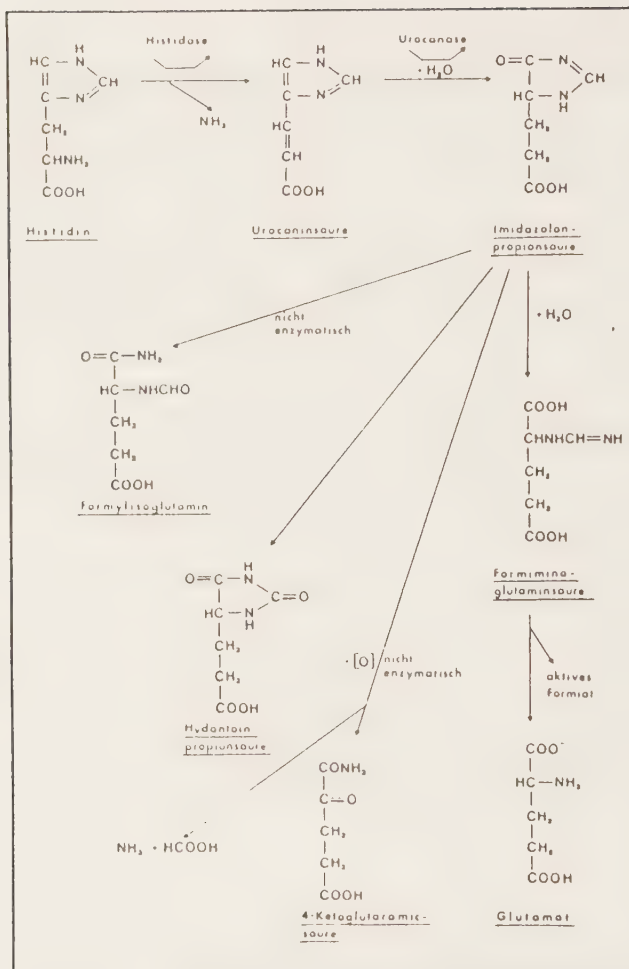


Abb.1: Abbau des Histidins zu Urocaninsäure und Formimino-glutaminsäure

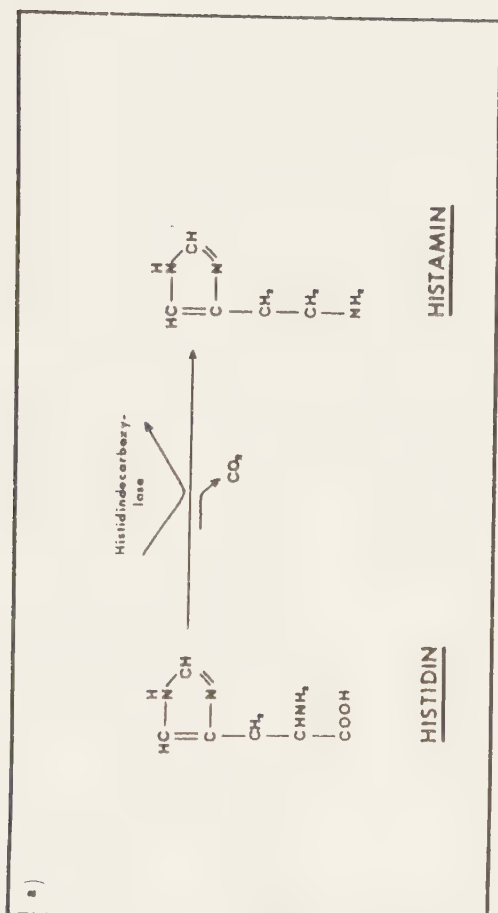
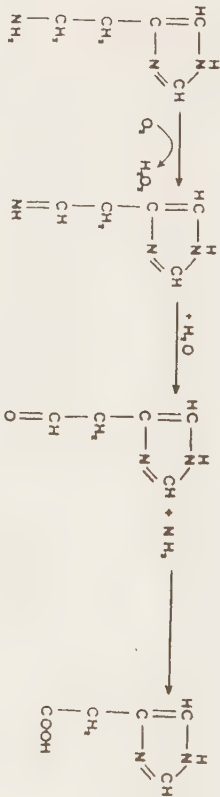


Abb. 2a: Decarboxylierung des Histidin zu Histamin.

b)



HISTAMIN

IMIDAZOLACET-
ALDEHYD

IMIDAZÖL-
ESSIGSÄURE

Abb. 2b: Inaktivierung des Histamin.

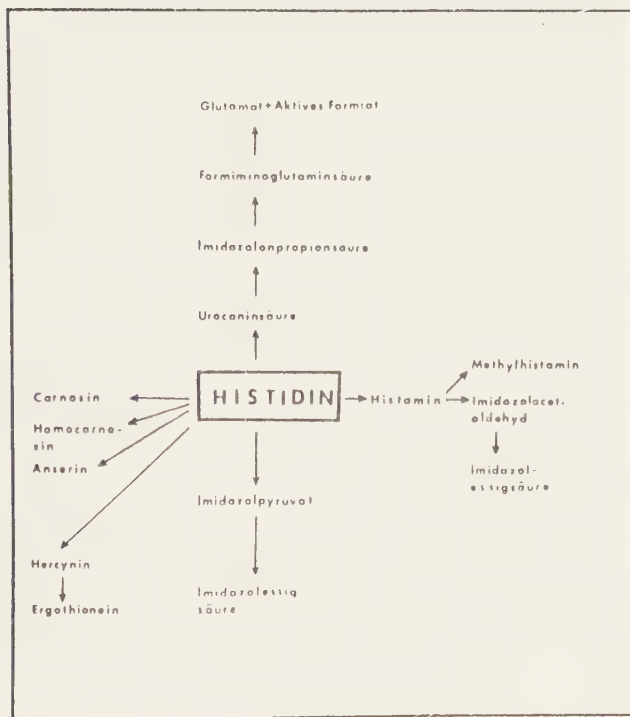


Abb.3: Schematische Zusammenfassung des Histidinstoffwechsels

11. Materialien und Methoden

1. Materialien:

Zur Durchführung der Histidasemessung wurden folgende Substanzen benötigt: L-(U-14C)-Histidin, 10 μ Ci/ml, erhalten von der Firma Amersham-Buchler, (33 Braunschweig, Postfach 1120); Dowex-Cation-Exchange-Resin AG-50-W-X8/ 200-400 mesh (Hydrogen-Form), erhalten von der Firma Serva-Feinbiochemica (Heidelberg).

Weiterhin wurden selbst hergestellt:

0,1-molarer Pyrophosphatpuffer pH 8,75; 0,01-molarer Pyrophosphatpuffer pH 9,2; 20-milimolare Histidinlösung; 20 milimolare Dithiothreitolösung; 10 milimolare Urocaninsäure; 0,2-molarer Natriumcitratpuffer pH 6,0.

Zum Stoppen der Reaktion wurde 75 %ige Trichloressigsäure verwendet. Zur chromatographischen Trennung von Histidin und Urocaninsäure wurden kleine Kunststoffsäulen mit einem Durchmesser von 8 Millimetern verwendet.

2. Methoden

a) Versuch

Zur Histidasemessung wurde die Methode von Wegele (24) und Shin et al. (19) übernommen, die in folgendem Abschnitt kurz beschrieben werden soll.

Die Aktivitätsmessung der Histidase beruht auf der Messung von Urocaninsäure, die mit Hilfe des in der Eponychialhaut vorhandenen Enzyms Histidase, aus Histidin entstanden ist.

Da bei Patienten mit Histidinämie die Histidaseaktivität sehr gering bis nahezu Null ist, können hier folglich nur sehr kleine Mengen Urocaninsäure nachgewiesen werden. Die Trennung von Urocaninsäure und Histidin erfolgt durch Ionenaustauschchromatographie. Auf die unterschiedlichen Ladungseigenschaften von Urocaninsäure und Histidin wurde bereits in der Einleitung hingewiesen. Die Eponychialhaut wurde in hundert Teilen 0,01-molarem Pyrophosphatpuffer, pH 9,2, mit einem Glas-homogenisator homogenisiert, anschließend kurz sonifiziert und zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Enzymmessung weiterverwendet.

Die Histidasemessung erfolgte in einem Reaktionsgemisch, das 0,06 μCi /0,18 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (U- ^{14}C) Histidin, 1,2 μmol Pyrophosphatpuffer pH 8,75, 60 nmol Dithiotreit und ca. 0,3 mg Eponychialgewebe enthielt und dessen Endvolumen 60 μl betrug.

Nach dreistündiger Inkubation bei 37 Grad Celsius und anschließendem Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 5 μl 75 %iger TCA wurden Urocaninsäure und Histidin auf einer kleinen, mit 2 ml Dowex 50-X-8 gefüllten Säule (0,8 cm x 2,0 cm) getrennt. Bevor die Inkubationsgemische auf die Säulen gegeben wurden, wurde zu jeder Probe 50 nmol nicht radioaktive Urocaninsäure gegeben. Mit dieser Maßnahme wird ein besseres Auswaschen der, auch bei normaler Histidaseaktivität nur in sehr geringen Mengen gebildeten, Urocaninsäure ermöglicht.

Zur Elution wurde 0,2-molarer Natriumcitratpuffer pH 6,0 verwendet. Im Eluat erschien nach einem ml Formiminoglutaminsäure, nach 2 ml Urocaninsäure und nach 4,5 ml Histidin (in der Haut und in fetaler Leber wird Histidin zu Urocaninsäure umgewandelt, in adulter Leber wird es weiter zu Formiminoglut-

aminsäure metabolisiert). Gezählt wurden jeweils die ersten drei ml des Eluats, mit einem Flüssigkeitsscintillationszähler der Marke Delta 300, Modell 8690 (Fa. Searle Analytic Inc. Des Plaines, Illinois 60018). Hierin befand sich noch kein Histidin und die gemessene Radioaktivität stammte lediglich aus der entstandenen Urocaninsäure. Die Proteinmessung zur anschließenden Aktivitätsberechnung erfolgte mit der Micro-Methode nach Lowry.

Im Scintillationszähler wurden für jede Probe, für die 100 %-Werte und für die Leerwerte die Scintillationsblitze pro Minute gezählt (= cpm oder Counts per Minute). Die spezifische Aktivität pro eingebrachter Proteinmenge läßt sich nach folgender Formel berechnen:

$$A = \frac{(\text{cpm Eluat} - \text{cpm 0})}{(\text{cpm 100 \%} - \text{cpm 0})} \times \frac{C \times F}{t \times P} \quad (\mu\text{mol/g/h})$$

C = Histidinmenge im Reaktionsgemisch (μMol)

F = Verdünnungsfaktor des Histidins im Reaktionsgemisch

t = Inkubationszeit

P = Proteinmenge im Reaktionsgemisch (g)

Mit den auf diese Weise erhaltenen Histidaseaktivitäten der Haut war es möglich, Homozygote von Heterozygoten und Gesunden zu unterscheiden.

b) Prinzip der Enzymkinetik

Um das unterschiedliche Verhalten der Histidase bei Homozygoten, der Zwischengruppe, bei Heterozygoten und bei Gesunden noch weiter zu untersuchen, wurde eine Studie zur Enzymkinetik durchgeführt. Untersucht wurden dabei Patienten, zum Teil auch Eltern und Geschwister aus insgesamt vier Familien. Außerdem wurden zum Vergleich mehrere Kinetiken an Gesunden durchgeführt (Kontrollgruppe).

Zunächst soll aber das Prinzip der Enzymkinetik im allgemeinen noch kurz erklärt werden.

Eine Enzymreaktion läuft in zwei Schritten ab:

1. Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes:



Darauf läßt sich das Massenwirkungsgesetz anwenden:

$$\frac{[E] \times [S]}{[ES]} = K_S \quad (\text{Gleichung 2})$$

2. Bildung des Produktes:



(E=Enzym; ES=Enzym-Substrat-Komplex; S=Substrat; P=Produkt)

Michaelis und Menten setzten voraus, daß Reaktion 2 langsamer abläuft als Reaktion 1, also geschwindigkeitsbestimmend ist. Sie läuft außerdem vollständig ab. Ihre Reaktionsgeschwindigkeit ist proportional der Konzentration des Enzym-Substratkomplexes, in unserem Fall der Konzentration des Histidin. Wenn alles Enzym als Enzym-Substratkomplex vorliegt (Sättigungskonzentration), ist die maximale Reaktionsgeschwindigkeit er-

reicht. Diese Sättigungskonzentration ist jedoch experimentell schwer zu bestimmen. Einfacher zu bestimmen ist hingegen die halbmaximale Geschwindigkeit, also die Substratkonzentration (in Mol/Liter), bei der die Hälfte des Enzyms als Enzym-Substratkomplex vorliegt. Sie wird als Michaelis-Menten-Konstante bezeichnet und ist von Enzym zu Enzym und für ein Enzym von Substrat zu Substrat verschieden.

$$S_{\text{halbmax. Geschw.}} = K_m \quad (\text{Gleichung 4})$$

Nach unserer Voraussetzung ist die Reaktionsgeschwindigkeit der Konzentration des Enzym-Substratkomplexes proportional.

$$v = k_{+2} \times ES \quad (\text{Gleichung 5})$$

Durch Umformung von Gleichung 2 ergibt sich

$$\frac{(E_t - ES) \times S}{ES} = \frac{E_t \times S}{K_m + S} \quad (\text{Gl. 6})$$

und durch Einsetzen von Gleichung 5

$$k_{+2} \times \frac{E_t \times S}{K_m + S} = \frac{v_{\text{max.}} \times S}{K_m + S} \quad (\text{Gl. 7})$$

Die Bestimmung von K_m und $v_{\text{max.}}$ ist relativ einfach, wenn man statt Gleichung 7 den reziproken Ausdruck nimmt.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\text{max.}} \times S} + \frac{1}{v_{\text{max.}}} \quad (\text{Gl. 8})$$

Wenn man als Variablen $\frac{1}{v}$ (Kehrwert der Umsatzgeschwindigkeit, also der, bei der jeweiligen Substratkonzentration errechneten Aktivität) und $\frac{1}{S}$ (jeweils angebotene Substratkonzentration) verwendet, dann ist die Gleichung 7 die Funktion einer Geraden $y = ax + b$, aus der sich $\frac{1}{K_m}$ und $\frac{1}{v_{max}}$ als Koordinatenabschnitte leicht ermitteln lassen. Experimentell läuft dies folgendermaßen ab: In Gemischen mit unterschiedlichen Histidinkonzentrationen (Substrat) wird nach der in Teil II beschriebenen Methode jeweils die Enzymaktivität (in $\mu\text{mol/h/gProt.}$) bestimmt. Aus den Kehrwerten von Substratkonzentrationen und Aktivitäten wird ein Lineweaver-Burk-Diagramm erstellt, aus dem K_m und v_{max} leicht abzulesen sind (21).

Die Reaktionsgemische blieben bis auf die unterschiedlichen Histidinkonzentrationen dieselben. Die Histidinmengen in den Reaktionsgemischen betrugen in jeder Kinetik jeweils 180 nMol (= 3 mMol/L Endkonzentration), 90 nMol (= 1,5 mMol/L Endkonzentration), 45 nMol (= 0,75 mMol/L Endkonzentration), 18 nMol (= 0,3 mMol/L Endkonzentration) und 9 nMol (= 0,15 mMol/L Endkonzentration). Das heißt also, die Lineweaver-Burk-Diagramme wurden jeweils mit sechs verschiedenen Reaktionsgemischen fallender Histidinkonzentration ermittelt.

Auch die übrigen Versuchsbedingungen blieben dieselben (siehe Teil a). Außer den Kinetiken an Gesunden wurden Kinetiken an, zur Zwischengruppe gehörigen, an Heterozygoten und an Homozygoten durchgeführt.

III. Patienten

Aus dem "Department für Neonatologie und Angeborene Störungen" in Wien (Leitung: Professor O.Thalhammer, Univ. Kinderklinik, Währinger Gürtel 74-76, A-1090 Wien) erhielten wir Untersuchungsmaterial von 25 Patienten und deren Angehörigen. Die Eponychialhaut wurde dort nach der Abnahme in Eppendorfhütchen verpackt und auf dem Postwege hierhergesandt. Um den Aktivitätsabfall während der Versandzeit zu überprüfen, wurde in München folgender Kontrollversuch durchgeführt: Eponychialhaut wurde am Versuchsort frisch abgenommen. Ein Teil davon wurde sofort homogenisiert und anschließend die Histidaseaktivität bestimmt (Teil A). Der zweite Teil (B) wurde drei Tage unbehandelt bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Anschließend wurde er wie Teil A weiterverarbeitet.

Als Ergebnis erhielt man für Teil B annähernd die gleiche Enzymaktivität wie in Teil A, d.h. also, der Aktivitätsabfall während der Versandzeit ist vernachlässigbar gering. Bei sofortigem Homogenisieren nach Erhalt der Probe und anschließender Versuchsdurchführung bzw. Einfrieren bei - 20 Grad Celsius nach dem Homogenisieren und anschließender Histidasemessung konnte man also relativ gute Ergebnisse erzielen.

Aus dem "Department für Neonatologie und Angeborene Störungen" erhielten wir außerdem Angaben über den dortigen Untersuchungsgang nach Erfassung eines Histiäinämieverdächtigen Kindes. Zusätzlich wurden uns die mit den dortigen Methoden ermittelten Meßergebnisse derjenigen Patienten übersandt, von denen später die Histidasemessung durchgeführt werden soll.

Im Verdachtsfall wird dort folgender Untersuchungsang durchgeführt:

- a) Erste Blutabnahme auf der Geburtshilfe am Ende der ersten Lebenswoche, daraus Guthrietest und Dünnschichtchromatographie auf Histidin und Bestimmung der Urocaninsäure.
- b) Vor der Klinikaufnahme noch zwei Kontrollen, aus denen dieselben Untersuchungen gemacht werden.
- c) Urocaninsäurebestimmung der Haut mittels Dünnschichtchromatographie.
- d) Histidinbelastung und Tagesprofil.
- e) Diäteeinstellung je nach Ergebnis des Tagesprofils, d.h. Histidin unter 8 mg% keine Diät, über 8 mg% histidinarme Diät mit 35 mg% Histidin/kg Körpergewicht/Tag.

Weiterhin werden noch Histidinbelastungen der Eltern und Kinder sowie psychologische Tests angeschlossen.

IV. Ergebnisse

1. Serumhistidin- und Urocaninsäurespiegel der untersuchten Patienten

Aus dem "Department für Neonatologie und angeborene Störungen" (Univ.-Kinderklinik, Wien) erhielten wir die mit den dortigen Methoden ermittelten Serumhistidin- und Urocaninsäurespiegel derjenigen Patienten, von denen anschließend die Histidaseaktivität bestimmt werden soll. Die Histidinkonzentrationen wurden dort mittels Guthrietest und Dünnschichtchromatographie ermittelt. Außerdem wurden Histidinmessungen unter Belastung mit Histidinmonohydrochlorid durchgeführt. Die Messung der Urocaninsäure erfolgte ebenfalls mittels Dünnschichtchromatographie. Zusätzlich wurde die Urocaninsäure der Haut bestimmt.

Die mittels Guthrietest ermittelten Serumhistidinkonzentrationen lagen in einem Bereich zwischen 4 mg% und 12 mg%. Mit der Methode der Dünnschichtchromatographie erhielt man Werte zwischen 1 und 8 mg%.

Die durch Dünnschichtchromatographie ermittelten Urocaninsäurewerte waren, ebenso wie die Urocaninsäurewerte der Haut alle negativ.

Nach Belastung mit Histidinmonohydrochlorid zeigte sich in fast allen Fällen ein deutlicher Anstieg der Serumhistidinkonzentrationen. Die maximalen Serumhistidinwerte lagen in 13 Fällen bei 20 mg% oder darüber. Hier bewegten sich die Ausgangshistidinwerte zwischen 4 und 8 mg%. In sechs Fällen betrug die maximale Histidinkonzentration 12 mg% ausgehend von Anfangswerten zwischen 2 und 8 mg%. Dreimal fand sich ein Maximalwert von 8 mg% bei Ausgangswerten zwischen 1 und 6 mg%. In den übrigen drei Fällen zeigte sich ein Maximalwert von 6 mg% bei Ausgangswerten von 1 mg%.

PATIENT	GUTH- RIE- TEST HIS- TIDIN	DÜNN- SCHICHT- CHROMATOGR- APHIE	UROCA- NIN- SÄURE DER HAUT	BELA- STUNG	MIT HISTIDINMONOHYDROCHLORID (140 mg/kg KG.)								
					T ₀ (mg%)	30min. (mg%)	1h (mg%)	2h (mg%)	3h (mg%)	4h (mg%)	5h (mg%)	24h (mg%)	48h (mg%)
I-K ₁	3mg%	6mg%	neg.	4-6	12	12	12-20	12-20	12-20	8-12	8-12	8-12	8-12
II-K ₁	4mg%	1mg%	neg.	3	8-12	20	20	>20	20	>20	8-12	8-12	8-12
III-K ₁	4mg%	1mg%	neg.	4-6	6	4-6	4	6	6	6	6-8	4-6	4-6
IV-K ₁	6mg%	4mg%	neg.	4	6-8	8-12	8-12	8	8-12	8-12	8-12	8-12	3-12
V-K ₁	5mg%	2mg%	neg.	2-4	4-6	6-8	6-8	8	6-8	6-8	6-8	6-8	6-8
VI-K ₁	4-6mg%	2mg%	neg.	2-4	8-12	6-8	6-8	8	8	8	6-8	6-8	6-8
VII-K ₁	4-6mg%	6mg%	neg.	2	4	4-6	4-6	6-8	6-8	8-12	6-8	6-3	4-6
VIII-K ₁	4-6mg%	2mg%	neg.	3-12	8-12	20	20	12-20	12-20	6-8	12	20	12-20
VII-K ₂	keine Werte erhalten		neg.	8	3-12	12	12	8-12	8-12	8-12	20	8-12	8-12

Tab. 1

PATIENT	GUTH- RIE- TEST HIS- TIDIN	DÜNNSCHICHT- CHROMATOGRAM- PHIE	UROCA- MIN- SÄURE DER	BELA- STUNG	MIT HISTIDINMONOHYDROCHLORID (140 mg/kg KG.)							
		HISTI- DIN	UROCA- MIN- SÄURE	T ₀ (mg%)	30min. (mg%)	1h (mg%)	2h (mg%)	3h (mg%)	4h (mg%)	5h (mg%)	24h (mg%)	48h (mg%)
IX-K ₁	12mg%	4mg%	neg.	1	2-4	4	4	6	6	4-6	4	4-6
X-K ₁	4-6mg%	1mg%	neg.	1-2	6-8	8	8	8-12	8-12	8-12	6	6-8
XI-K ₁	6mg%	1mg%	neg.	2-4	3-12	12-20	8-12	6-8	12	8-12	8-12	8-12
XII-K ₁	8mg%	6-8mg%	neg.	4-6	3-12	3-12	12	8-12	8-12	8-12	12-20	8-12
XIII-K ₁	6-8mg%	2-4mg%	neg.	4-6	12	3-12	12	12-20	12	12	8-12	3
XIV-K ₁	6mg%	4-6	neg.	1	1-2	2-4	2-4	2-4	2-4	4-6	2-4	1
XV-K ₁	4mg%	4mg%	neg.	1-2	8-12	8	6-8	8-12	12-20	8-12	8-12	6
XVI-K ₁	6mg%	keine D. Chr.	neg.	2-4	12-20	12-20	12	12	8-12	12-20	8-12	6
XVII-K ₁	3mg%	1mg%	neg.	1	8	12	12	12	3	3	6	4

PATIENT	GUTH- RIE- TEST HIS- TIDIN	DÜNN- SCHICHT- CHROMATO- GRAPHIE	UROCA- NIN- SÄURE DER HAUT	BELA- STUNG	MIT HISTIDINMONOHYDROCHLORID (140 mg/kg KG.)									
				T ₀ (mg%)	30min. (mg%)	1h (mg%)	2h (mg%)	3h (mg%)	4h (mg%)	5h (mg%)	24h (mg%)	48h (mg%)		
XVIII-K ₁ XIX-K ₁ XX-K ₁ XXI-K ₁	6mg%	4mg% neg.	neg.	6-8 8 6	keine Histidinbelastung durchgeführt									
	6mg%	2mg% neg.	neg.		8-12	12	12-20	12-20	12-20	12	12	6		
	6mg%	2mg% neg.	neg.		12-20	12-20	8-12	12	8	12	12	12-20		
	12mg%	keine D.Cnr. durchgeführt	neg.		12-20	12-20	12-20	12-20	12-20	12-20	12-20	12-20		
XXII-K ₁ XXIII-K ₁ XXIV-K ₁	4-6mg%	4-6mg% neg.	neg.	4-6	8-12	8-12	8-12	8-12	12	8-12	8-12	8-12		
	4mg%	1mg% neg.	neg.	1	2	2	4	4-6	4-6	4	4-6	4-6		
	6-8mg%	1mg% neg.	neg.	4-6	12	12-20	12-20	12-20	12	20	12-20	8-12		

Erklärung: I-XXIV = Nummerierung der Familien;

K = Kinder;

I-K₁ bis XXIV-K₁ und VIII-K₂ = Patienten

2. Histidaseaktivitäten der 24 untersuchten Familien

Mit den in Teil II beschriebenen Methoden wurden die Histidaseaktivitäten von insgesamt 24 Familien sowie mehreren Kontrollpersonen bestimmt. Die Histidaseaktivitäten für Patienten, Eltern, Geschwister und Gesunde ließen sich folgendermaßen unterteilen:

<u>Gruppe 1:</u> <u>Patienten</u>	n	<u>Enzymaktivität</u>	
		$\mu\text{mol/h/gProtein}$	$\mu\text{mol/h/gGewebe}$
Homozygote	20	$1,4895 \pm 0,87^1$ $0,04-2,8^2$	$0,1768 \pm 0,1237$ $0,003-0,38$
Zwischengruppe	5	$6,656 \pm 1,328$ $5,4-8,9$	$0,498 \pm 0,155$ $0,37-0,72$

¹Mittelwert $\pm$ Standardabweichung; ²Bereich;

<u>Gruppe 2:</u> <u>Eltern</u>	n	<u>Enzymaktivität</u>	
		$\mu\text{mol/h/gProtein}$	$\mu\text{mol/h/gGewebe}$
Homozygote	10	$1,962 \pm 0,642$ $0,64-2,6$	$0,1473 \pm 0,094$ $0,003-0,34$
Zwischengruppe	15	$5,235 \pm 1,2338$ $2,83-7,3$	$0,413 \pm 0,14038$ $0,26-0,78$
Heterozygote	20	$16,808 \pm 4,654$ $8,93-25,9$	$1,528 \pm 0,739$ $0,66-2,4$

<u>Gruppe 3:</u> <u>Geschwister</u>	n	Enzymaktivität	
		$\mu\text{mol/h/gProtein}$	$\mu\text{mol/h/gGewebe}$
Homozygote	7	$1,63 \pm 0,915$	$0,1233 \pm 0,075$
		0,03-2,7	0,003-0,22
Zwischengruppe	7	$5,651 \pm 0,975$	$0,505 \pm 0,1142$
		3,96-6,81	0,33-0,67
Heterozygote	1	15,1	0,75
		15,1	0,75

<u>Gruppe 4:</u> <u>Gesunde</u>	n	Enzymaktivität	
		$\mu\text{mol/h/gProtein}$	$\mu\text{mol/h/gGewebe}$
	10	$52,3 \pm 16,5$	$5,04 \pm 1,89$
		27,0-83,0	2,20-8,56

Daraus ergab sich folgende Aufteilung in Homozygote, Heterozygote und Gesunde:

<u>Untersuchte</u> <u>Personen</u>	n	Enzymaktivität	
		$\mu\text{mol/h/gProtein}$	$\mu\text{mol/h/gGewebe}$
Homozygote	37	$1,46 \pm 0,80$	$0,17 \pm 0,13$
		0,03-2,80	0,01-0,38
Heterozygote	21	$16,5 \pm 4,49$	$1,35 \pm 0,47$
		8,93-25,9	0,66-1,95
Gesunde	10	$52,3 \pm 16,5$	$5,04 \pm 1,89$
		27,0-83,0	2,20-8,56

Außerdem ließ sich noch eine Zwischengruppe herausarbeiten, deren Histidaseaktivität zwischen den Histidaseaktivitäten von Homozygoten und Heterozygoten lag.

<u>Untersuchte</u> <u>Personen</u>	n	Enzymaktivität	
		$\mu\text{mol/h/gProtein}$	$\mu\text{mol/h/gGewebe}$
Zwischengruppe	27	$5,80 \pm 0,80$	$0,47 \pm 0,12$
		$4,65 - 7,30$	$0,26 - 0,72$

Die Tabellen 4 - 11 zeigen die erhaltenen Histidaseaktivitäten der 24 untersuchten Familien, unterteilt in Gruppe I = Homozygote, Gruppe II = Zwischengruppe, Gruppe III = Heterozygote, Gruppe IV = Gesunde (Kontrollgruppe).

(Zu den Abkürzungen: V=Vater, M=Mutter, K=Kind,
K₁=Patient und Familie VIII, K₂=Patient)

Tabelle 4:

Gruppe I (Homozygote)

Patient bzw. Familien- mitglied	Alter (a) z.Z.der Unter- suchung	Aktivität $\mu\text{mol/h/gProt.}$	Aktivität $\mu\text{mol/h/gGewebe}$
I-K ₁	5	1,5	0,37
II-K ₁	5	1,5	0,38
III-K ₁	1 $\frac{1}{2}$	2,1	0,27
IV-K ₁	3 $\frac{1}{2}$	1,4	0,23
V-K ₁	1	1,7	0,32
VI-K ₁	4	1,5	0,13
VI-K ₂	7	2,2	0,2
VII-K ₁	7	1,6	0,3
VIII-K ₁	3 $\frac{1}{2}$	0,3	0,02
X-V	22	2,2	0,2
X-K ₁	1 $\frac{1}{2}$	2,1	0,19
XI-M	35	1,7	0,08
XI-K ₁	1	1,4	0,13
XI-K ₃	11	2,7	0,13

Tabelle 5:

Gruppe I (Homozygote)

Patient bzw. Familien- mitglied	Alter (a) z.Z.der Unter- suchung	Aktivität $\mu\text{mol/h/gProt.}$	Aktivität $\mu\text{mol/h/gGewebe}$
XII-K ₁	7	2,8	0,32
XIII-V	40	2,6	0,34
XIII-K ₂	5	1,3	0,13
XIV-K ₁	3	2,4	0,16
XIV-K ₂	10	2,0	0,12
XV-K ₁	6 ¹ / ₂	1,1	0,04
XVI-K ₁	9	0,22	0,01
XVII-V		0,64	0,05
XVII-K ₁	7	0,04	0,003
XVII-K ₃	21	2,2	0,22
XVII-K ₄	17	0,98	0,06
XVIII-K ₂		0,03	0,003
XIX-M	20	2,5	0,18
XIX-K ₁	2	2,8	0,22

Tabelle 6:

Gruppe I (Homozygote)

Patient bzw. Familien- mitglied	Alter (a) z.Z.der Unter- suchung	Aktivität $\mu\text{mol/h/gProt.}$	Aktivität $\mu\text{mol/h/gGewebe}$
XX-V	38	1,36	0,10
XXI-K ₁	11	1,28	0,16
XXII-K ₁	$\frac{1}{2}$	0,05	0,003
XXIII-V	25	2,5	0,18
XXIII-M	22	2,5	0,18
XXIII-K ₁	2	2,8	0,18
XXIV-V	30	1,5	0,003
XXIV-K ₁	5	1,2	0,1
XX-M	42	2,11	0,16

Tabelle 7:

Gruppe II (Zwischengruppe)

Patient bzw. Familien- mitglied	Alter (a) z.Z.der Unter- suchung	Aktivität $\mu\text{mol/h/gProt.}$	Aktivität $\mu\text{mol/h/gGewebe}$
I-M	22	4,7	0,42
III-V	32	5,0	0,46
III-M	27	6,5	0,78
VI-M	30	3,8	0,37
VII-K ₂	11	5,0	0,67
VIII-V	32	6,8	0,42
VIII-M	32	7,3	0,31
VIII-K ₂	1	8,9	0,38
IX-K ₁	2	5,4	0,6
XI-V	37	4,7	0,3
XI-K ₂	9	5,3	0,61
XI-K ₄	7	6,0	0,46
XII-V	43	6,7	0,26
XIII-K ₁	3	6,1	0,72

Tabelle 8:

Gruppe II (Zwischengruppe)

Patient bzw. Familien- mitglied	Alter (a) z. Z. der Unter- suchung	Aktivität $\mu\text{mol/h/gProt.}$	Aktivität $\mu\text{mol/h/gGewebe}$
XIV-V	36	4,2	0,3
XIV-M	35	5,4	0,48
XVI-V		5,3	0,42
XVII-M		2,83	0,28
XVII-K ₂	14	3,96	0,33
XVIII-V	31	5,46	0,45
XVIII-M	26	5,83	0,62
XVIII-K ₁	2 $\frac{1}{2}$	6,3	0,37
XX-K ₁	2	6,58	0,42
XX-K ₂	10	6,03	0,51
XX-K ₃		6,81	0,50
XXIV-M	26	4,0	0,33
XXIV-K ₂	7	6,46	0,46

Tabelle 9:

Gruppe III (Heterozygote)

Patient bzw. Familien- mitglied	Alter (a) z.Z.der Unter- suchung	Aktivität $\mu\text{mol/h/gProt.}$	Aktivität $\mu\text{mol/h/gGewebe}$
II-M	32	20,0	1,22
IV-M	24	20,0	1,54
V-V	26	20,0	1,53
V-M	24	12,0	0,78
VI-V	33	20,0	1,69
VII-V	43	13,0	1,9
VII-M	43	20,0	2,4
IX-M	36	12,5	1,37
IX-M	29	20,0	1,84
IX-K ₂	4	15,1	0,75
X-M	19	25,9	4,0
XII-M	44	18,5	1,93
XIII-M	28	11,0	0,78
XV-V	40	20,0	1,79

Tabelle 10:

Gruppe III (Heterozygote)

Patient bzw. Familien- mitglied	Alter (a) z.Z.der Unter- suchung	Aktivität $\mu\text{mol/h/gProt.}$	Aktivität $\mu\text{mol/h/gGewebe}$
XV-M	42	15,0	1,5
XVI-M		17,2	1,43
XIX-V	23	18,0	0,66
XXI-V	40	8,93	1,27
XXI-M	33	9,08	1,08
XXII-V	32	13,24	0,85
XXII-M	29	21,82	1,01

Tabelle 11: Gruppe IV (Kontrollgruppe von Gesunden)

Gesunde Kontroll- person	Aktivität $\mu\text{mol/h/gProt.}$	Aktivität $\mu\text{mol/h/gGewebe}$
A	47,25	4,16
B	83,0	5,04
C	52,8	3,89
D	64,93	4,857
E	55,58	4,158
F	83,0	8,93
G	83,0	8,56
H	60,0	5,265
I	60,0	4,29
K	46,54	4,1

3. Stammbäume der untersuchten Familien mit Histidinämie

Im folgenden Abschnitt soll durch Aufzeichnung der Stammbäume der untersuchten Familien das Vererbungsmuster der Histidinämie graphisch dargestellt werden.

Interessant ist hier vor allem, daß sich unter den Eltern erkrankter Kinder ausschließlich homozygote bzw. heterozygote Merkmalsträger befanden. Wäre dies nicht der Fall, d.h. befänden sich unter den Eltern auch genetisch Gesunde mit erkrankten Kindern, so spräche dies gegen einen autosomal-rezessiven Erbgang bei Histidinämie.

Auch unter den Geschwistern erkrankter Kinder finden sich bei den untersuchten Familien ausschließlich Homozygote bzw. Heterozygote. Hier könnten jedoch, entsprechend dem autosomal-rezessiven Erbgang, mit einer Wahrscheinlichkeit von $\frac{1}{4}$ auch genotypisch gesunde Kinder auftreten, wenn beide Elternteile heterozygote Merkmalsträger wären.

Da jedoch die Anzahl der untersuchten Familien mit zwei heterozygoten Elternteilen gering ist (6 Familien), vier dieser Familien jeweils nur ein Kind haben, das erkrankt ist, und die übrigen beiden Familien jeweils zwei Kinder haben, von denen eines an Histidinämie erkrankt ist, trifft diese Wahrscheinlichkeit nur auf insgesamt acht untersuchte Kinder zu. Es ist daher nicht verwunderlich, daß in den durchgeführten Untersuchungen kein genotypisch gesundes Kind auftritt. Eine wesentlich größere Anzahl von Familien mit zwei heterozygoten Elternteilen müßte untersucht werden, um die statistische Wahrscheinlichkeit von $\frac{1}{4}$ für genotypisch gesunde Kinder herauszuarbeiten.

Die Abbildungen 4 - 7 zeigen die Stammbäume der untersuchten Familien mit Histidinämie.

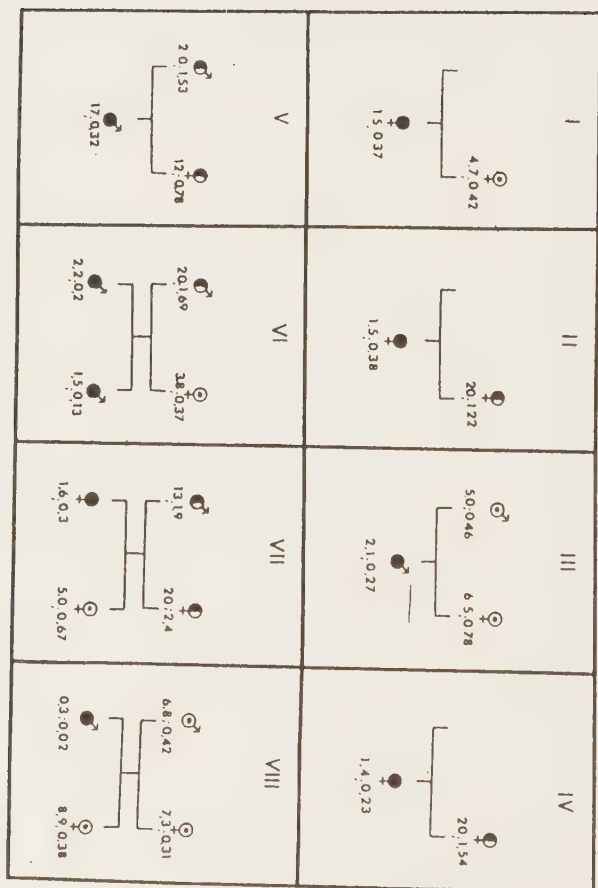


Abb. 4: ● Homozygote

○ Zwischengruppe

● Heterozygote

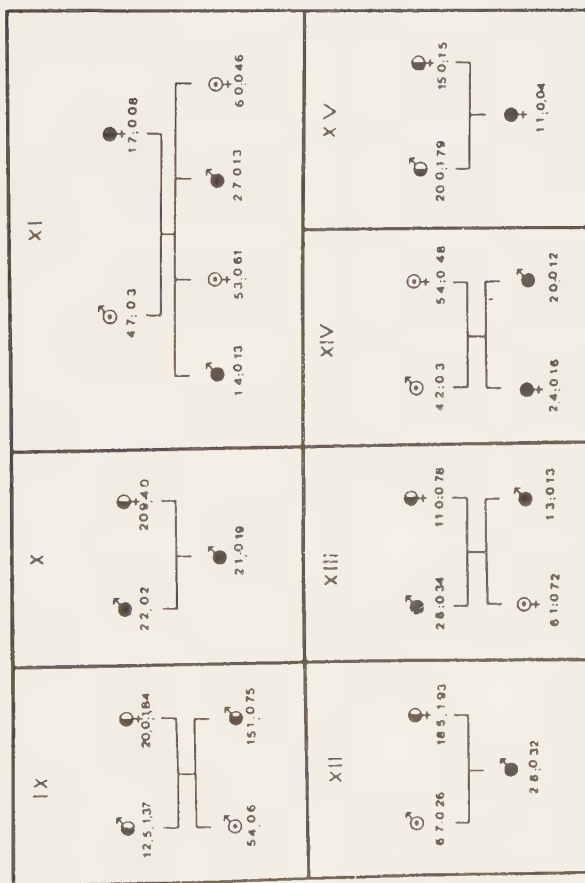


Abb. 5

X VI	X VII	X VIII
X IX	X X	X XI

Abb. 6

XXII	$\begin{array}{c} \text{♂} \\ 1224,085 \end{array}$ $\begin{array}{c} \text{♀} \\ 2182,110 \end{array}$ $\begin{array}{c} \text{♂} \\ 005,0003 \end{array}$	
XXIII	$\begin{array}{c} \text{♂} \\ 25,018 \end{array}$ $\begin{array}{c} \text{♀} \\ 25,018 \end{array}$ $\begin{array}{c} \text{♂} \\ 28,018 \end{array}$ $\begin{array}{c} \text{♀} \\ 25,018 \end{array}$	
XXIV	$\begin{array}{c} \text{♂} \\ 15,0003 \end{array}$ $\begin{array}{c} \text{♀} \\ 40,033 \end{array}$ $\begin{array}{c} \text{♂} \\ 12,01 \end{array}$ $\begin{array}{c} \text{♀} \\ 646,046 \end{array}$	

Abb. 7

4. Vergleiche zwischen Serumhistidinspiegeln und Serum- histidaseaktivitäten

Kuroda et al. berichteten über eine gute Korrelation zwischen Serumhistidinspiegeln und Serumhistidaseaktivitäten (9). Dies konnte bei uns leider nicht beobachtet werden. Zwar lagen die Histidaseaktivitäten aller Patienten mit erhöhten Serumhistidinspiegeln bis auf einige Ausnahmen, auf die später noch eingegangen werden soll, im Bereich der Homozygoten. Versuchte man jedoch, innerhalb dieses Bereiches nochmals zu differenzieren, so konnte man keine Korrelation zwischen Serumhistidinspiegeln und Histidaseaktivitäten feststellen. Es fanden sich sowohl Patienten, deren Histidaseaktivität extrem niedrig waren, als auch Patienten, deren Histidaseaktivitäten an der oberen Grenze des Wertebereiches für Homozygote, bzw. im Bereich der Zwischengruppe lagen mit jeweils ähnlichen Serumhistidinkonzentrationen. Die erwartete umgekehrt proportionale lineare Abhängigkeit zwischen Serumhistidinkonzentrationen und Histidaseaktivitäten war nicht zu beobachten. Der Korrelationskoeffizient lag bei $-0,0595$.

Abbildung 8 zeigt eine graphische Darstellung der erhaltenen Histidaseaktivitäten in Abhängigkeit von den Serumhistidinkonzentrationen sowie die errechnete Regressionsgerade.

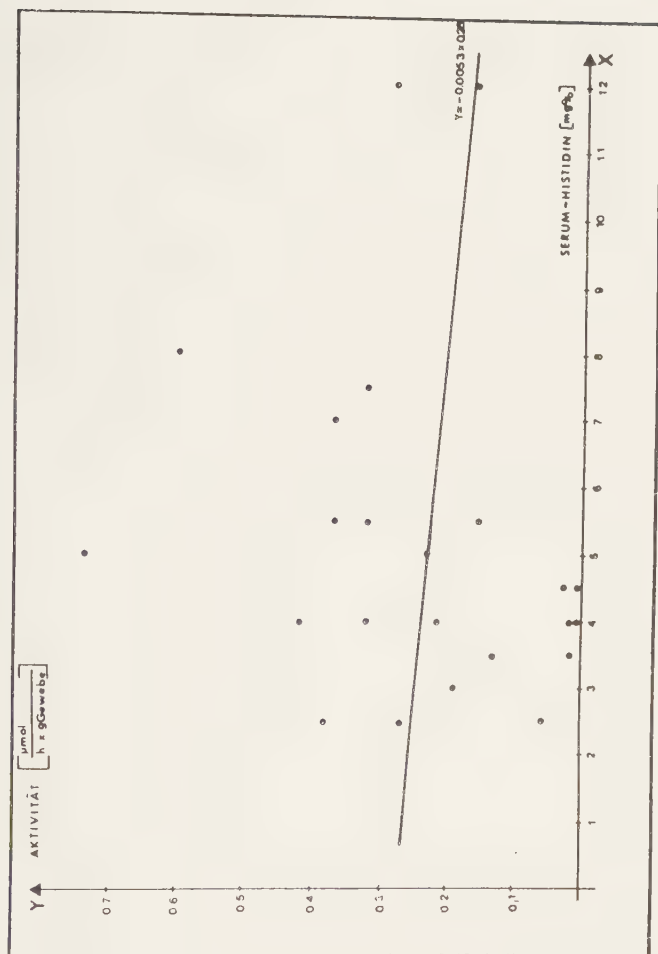


Abb. 8: Histidaseaktivität in Abhängigkeit von der Serumhistidin-konzentration ((Histidinkonzentration nach Guthrietest und Histidinkonzentration nach Dünnschichtchromatographie) :2).

5. Ergebnisse der Studie zur Enzymkinetik

Die K_m -Werte für Histidin lagen für die Kontrollwerte ($n=3$) (Gesunde) zwischen 1,0 mMol/l und 1,5 mMol/l (siehe Abb.9). Für Heterozygote erhielt man im Lineweaver-Burk-Diagramm etwas höhere K_m -Werte (bis 3,0 mMol/l; $n=3$; siehe Abb.10). Für die Zwischengruppe, deren Aktivitäten zwischen denen von Homozygoten und Heterozygoten lagen, erhielt man im Lineweaver-Burk-Diagramm nicht-lineare, hyperbolische Kurven, die wahrscheinlich durch eine Substrataktivierung zustande kamen (siehe Abb.11; $n=3$). Bei allen Homozygoten Probanden ($n=4$) erhielt man im Lineweaver-Burk-Diagramm nicht-lineare, unregelmäßig geschwungene Kurven, deren Werte für $\frac{1}{v}$ teilweise im Unendlichen lagen und die nur schwierig graphisch darzustellen waren. Die K_m - und v_{max} -Werte ließen sich hier nicht bestimmen (siehe Abb.12). Die Abbildungen 9 - 12 zeigen je ein Lineweaver-Burk-Diagramm der vier untersuchten Gruppen.

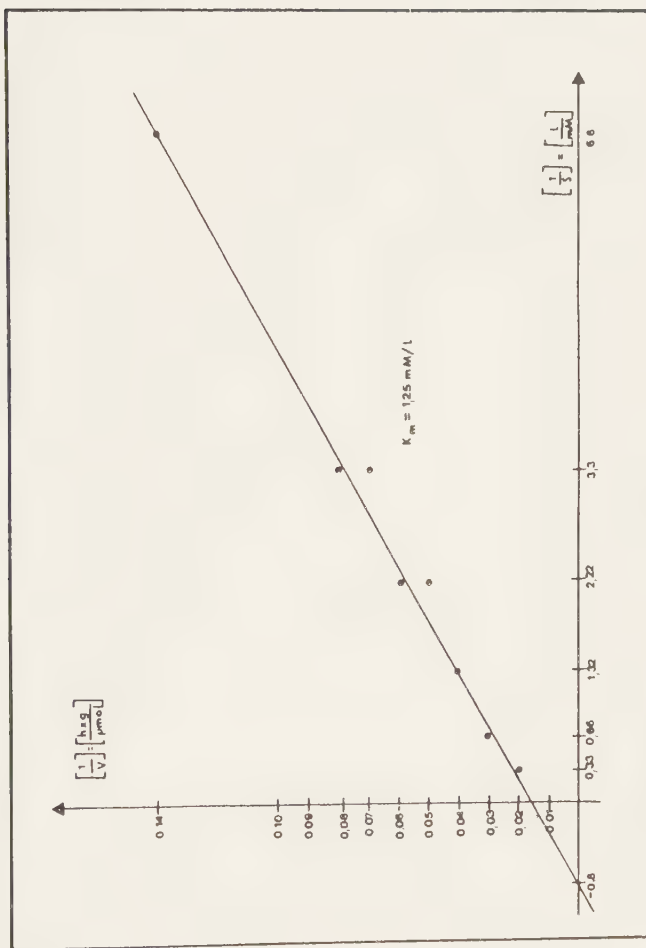


Abb. 9: Kinetik einer gesunden Kontrollperson

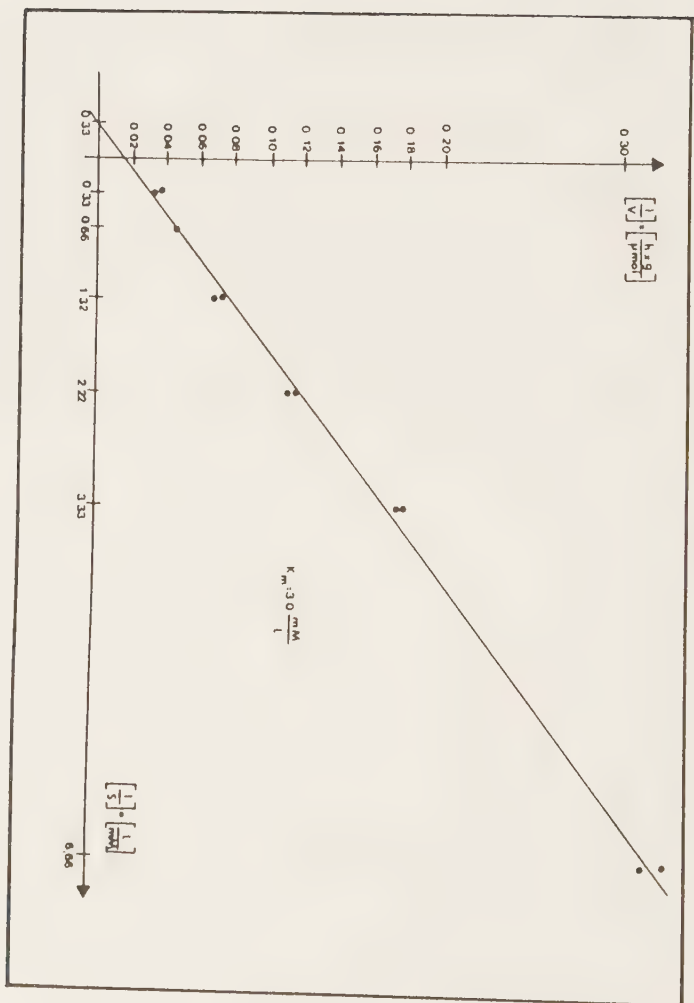


Abb. 10: Kinetik eines heterozygoten Probanden

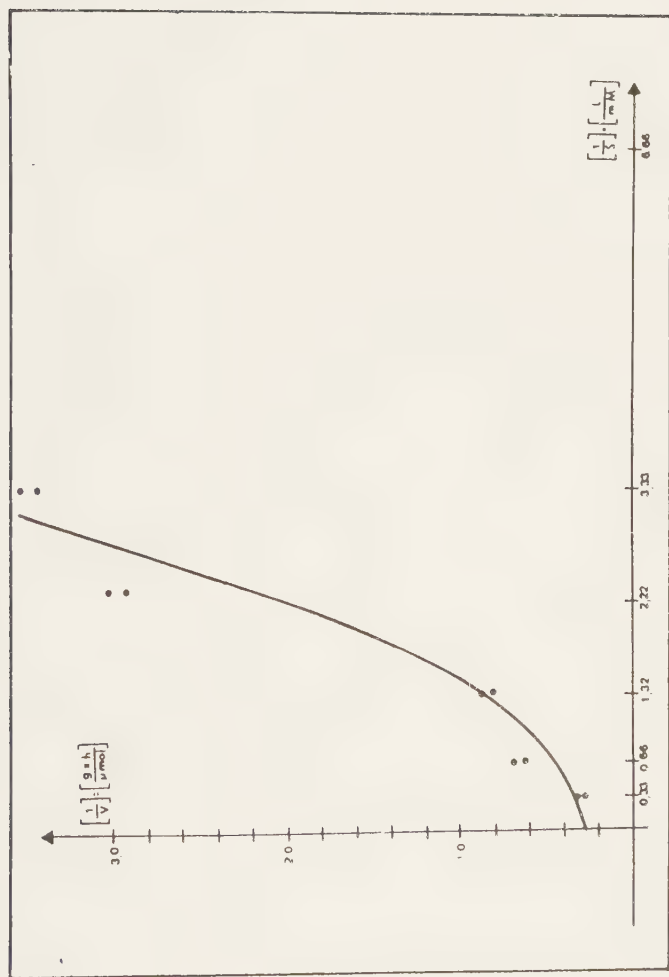


Abb. 11: Kinetik eines zur Zwischengruppe gehörenden Probanden

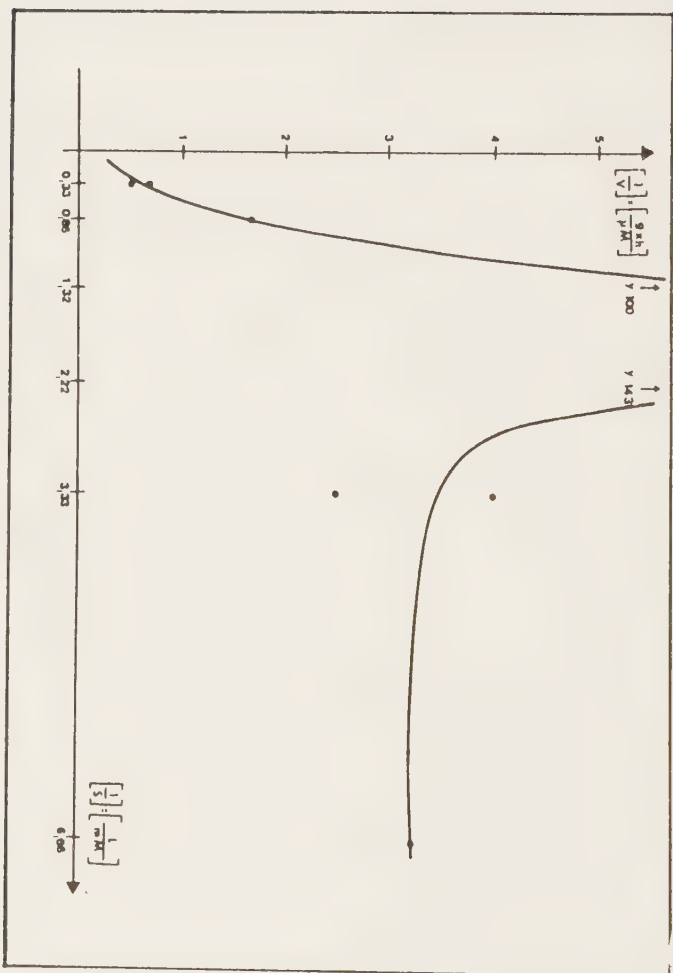


Abb. 12: Kinetik eines Patienten

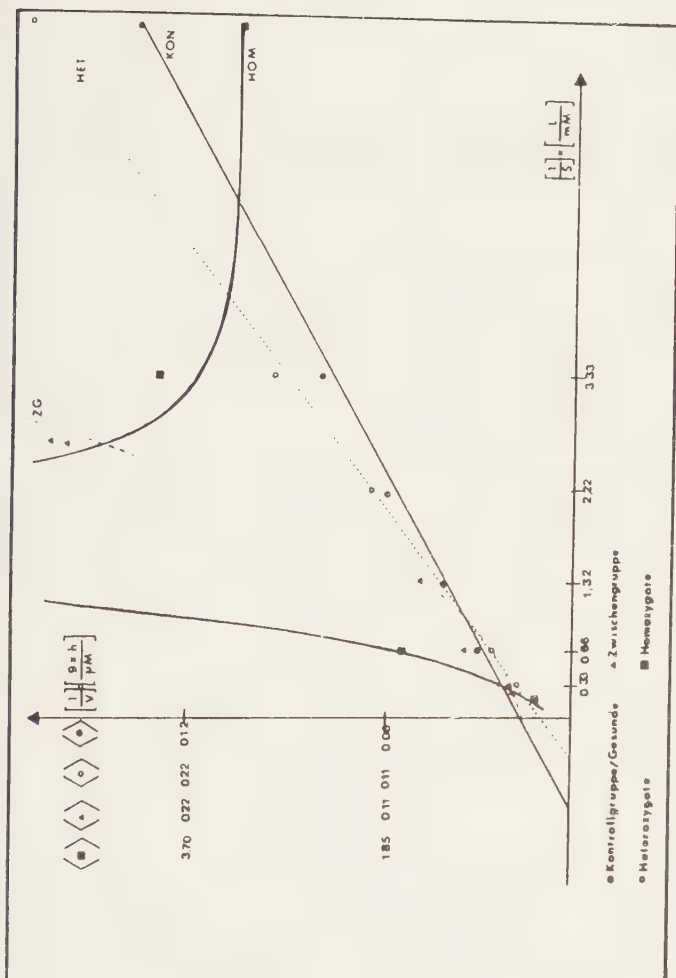


Abb. 13: Systematische Zusammenfassung der Ergebnisse der gesamten Kinetikstudie und Übersichtsdarstellung der, für die verschiedenen Gruppen erhaltenen Bilder im Lineweaver-Burk-Diagramm.

V. Diskussion

1. Histidaseaktivitäten der 24 untersuchten Familien und Charakterisierung der Zwischengruppe

Mit der in Teil III beschriebenen Methode ist eine deutliche Unterscheidung zwischen Homozygoten für Histidinämie, Heterozygoten und Gesunden möglich. Die Histidaseaktivitäten im Nagelfalz von Heterozygoten lagen bei etwa 30% der Enzymaktivitäten von Gesunden.

Kuroda et al. (8) konnten in der Haut von Heterozygoten bis zu 50% der Histidasewerte von normalen Kontrollpersonen messen. In unseren Untersuchungen zeigten sich keine Überschneidungen zwischen den Histidaseaktivitäten für Heterozygote mit den untersten Werten für gesunde Kontrollpersonen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Histidaseaktivität im Nagelfalz von insgesamt 95 Personen (25 Patienten, 60 Eltern und Geschwister von Patienten und 10 gesunde Kontrollpersonen) bestimmt.

Unter den Eltern und Geschwistern von Patienten fanden sich 16 Homozygote, 21 Heterozygote und 23 zur Zwischengruppe gehörende. Es ist nicht verwunderlich, daß sich unter den Eltern keine genotypisch Gesunden befinden. Wäre dies der Fall, so spräche dies, wie in Teil IV, Abschnitt 3 schon erklärt wurde, gegen einen autosomal-rezessiven Erbgang bei Histidinämie. Daß sich unter den Geschwistern von zwei heterozygoten Elternteilen keine genotypisch Gesunden befinden, was mit einer Wahrscheinlichkeit von 25% möglich wäre (siehe Teil IV, Abschnitt 3), ist als Zufall zu betrachten.

Bezüglich den 16 Homozygoten unter Eltern und Geschwistern von Patienten sei nochmals darauf hingewiesen, daß nicht alle für Histidinämie homozygoten Menschen Krankheitszeichen, wie geistige Zurückgebliebenheit oder sprachlich Retardierung, zeigen. Deshalb ist es auch verständlich, daß die Histidinämie der Eltern hier bis zur Geburt eines Kindes mit manifesten Krankheitszeichen unentdeckt blieb. Zur Zwischengruppe gehörten hauptsächlich phänotypisch gesunde Eltern und Geschwister von Patienten. Allerdings fanden sich hierbei auch fünf Ausnahmen (IX-K₁, XIII-K₁, XVIII-K₁, XX-K₁ und VIII-K₂) mit erhöhten Histidinspiegeln im Serum bzw. pathologischer Histidinbelastung, die zur Gruppe der Patienten gehörten. Abgesehen von diesen fünf, zur Gruppe der Patienten gehörigen Fällen zeigen sich jedoch keine weiteren Abnormitäten bei den übrigen, zur Zwischengruppe gehörigen Probanden, wie erhöhte Serumhistidinspiegel oder geistige Zurückgebliebenheit. So ist wohl anzunehmen, daß auch die Zwischengruppe genetisch zur Gruppe der phänotypisch gesunden, genotypisch Heterozygoten gehört.

Im folgenden Abschnitt wird versucht, eine mögliche Erklärung für die vier oben angeführten Ausnahmen mit erhöhten Serumhistidinspiegeln zu geben.

In Haut und fetaler Leber wird Histidin zu Urocaninsäure umgewandelt. In adulter Leber wird es weiter zu Formiminoglutaminsäure metabolisiert. Man könnte also sagen, daß nur eine kleine Menge von Histidase zur Desaminierung von Histidin ausreichend sein müßte, angesichts der sofortigen Beseitigung von Urocaninsäure durch Urocanase beim Erwachsenen (22, 24). Fehlt nun aber die Urocanase oder ist sie extrem niedrig, so kann Urocaninsäure nicht weiterverwandelt werden und kumuliert. Das bedeutet aber auch eine rückwirkende Verschiebung des Gleichgewichtes bei der Umwandlung von Histidin zur Urocaninsäure in Richtung Histidin. Verständlicherweise müßte sich dies besonders stark auswirken bei Menschen mit ohnehin schon

erniedrigter Histidaseaktivität. In bezug auf die fünf Ausnahmen in der "Heterozygoten-Zwischengruppe" würde dies bedeuten, daß es sich hier zwar um genetisch bezüglich Histidinämie heterozygote Patienten handelt, daß jedoch infolge eines niedrigen oder fehlenden Urocanasespiegels in der Leber Urocaninsäure nicht mehr weiterverwandelt wird, was wiederum über eine Gleichgewichtsverschiebung und, verstärkt durch den ohnehin schon erniedrigten Histidasespiegel, zu einer Anhäufung von Histidin führt.

Mit Ausnahme dieser fünf Fälle gehörten jedoch die übrigen 21 Patienten eindeutig zur Gruppe der Homozygoten (siehe Abschnitt III, Teil 2 und 3).

2. Serumhistidinspiegel in Abhängigkeit von den Histidaseaktivitäten

Wie in Abschnitt IV, Teil 4 schon berichtet wurde, fand sich bei Patienten keine Korrelation zwischen Serumhistidinspiegeln und Histidaseaktivitäten der Haut. Verschiedene Autoren erzielten bezüglich dieses Problems unterschiedliche Ergebnisse.

Kuroda et al. (9) führten Histidinbelastungen bei Patienten durch und fanden eine gute Korrelation zwischen Serumhistidinspiegeln und Histidaseaktivitäten der Haut. Sie schlossen daraus, daß die Histidaseaktivität der Haut die Histidaseaktivität in der Leber widerspiegelte. Woody et al. (25) hingegen berichteten über drei geistig retardierte Patienten, die einen Histidasemangel in der Leber aufwiesen, aber über eine beträchtliche Histidaseaktivität in der Haut verfügten. Thalhammer (22) konnte analog den in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnissen keine Korrelation zwischen Histidaseaktivitäten der Haut und Histidinspiegeln im Blut finden. Er fand ebenfalls keine Korrelation zwischen Histidaseaktivitäten der Leber und Histidinblutspiegeln. Die Histidinspiegel der von ihm untersuchten Patienten waren mit Werten zwischen 4 mg/100 ml und 20 mg/100ml sehr unterschiedlich und es ist unklar, weshalb Kinder mit Histidasemangel in Leber und Haut solche Unterschiede in den Plasmahistidinspiegeln aufweisen. Mit der in dieser Arbeit beschriebenen Methode ist es zwar möglich Homozygote von Heterozygoten und Normalen zu unterscheiden, aber es ist nicht möglich, Rückschlüsse auf die Serumhistidinspiegel innerhalb der Gruppe der Homozygoten an Hand der gemessenen Histidaseaktivitäten zu ziehen.

3. Enzymkinetik

Die Michaelis-Menten-Konstante bei normalen Histidaseaktivitäten der Haut lagen bei Kuroda et al. (11, 16) um 2,5 mMol. Wir erhielten für gesunde Kontrollpersonen Werte zwischen 1,0 und 1,5 mMol. Werte, die darüber lagen wurden bei heterozygoten Probanden beobachtet. Dies entspricht durchaus dem erwarteten Ergebnis, da bei Heterozygoten die Histidaseaktivität niedriger ist als bei Gesunden, die Substratkonzentration, bei der die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht ist ($=K_m$), also entsprechend höher sein muß.

Für die "Heterozygoten-Zwischengruppe", deren Histidaseaktivitäten zwischen denen von Homozygoten und Heterozygoten lagen, erhielt man im Lineweaver-Burk-Diagramm hyperbolische Kurven. Die K_m -Werte waren hier nicht zu bestimmen, da sich die Kurve im Diagramm asymptotisch der Abszisse näherte. Dennoch war ein zwar nicht linearer, aber kontinuierlicher Aufstieg im Lineweaver-Burk-Diagramm zu sehen. Dieser Effekt kam vermutlich durch eine Substrataktivierung zustande. Bei entsprechend hohen Substratkonzentrationen zeigte sich ein, verglichen mit niedrigen Substratkonzentrationen verstärkter, Anstieg der Enzymaktivität. Die Sättigungskonzentration für maximale Reaktionsgeschwindigkeit ließ sich nicht bestimmen.

Bei homozygoten Probanden erhielt man im Lineweaver-Burk-Diagramm unregelmäßig geschwungene Kurven. Die Werte für $\frac{1}{v}$ lagen teilweise im Unendlichen. Die K_m - und v_{max} -Werte ließen sich auch hier nicht bestimmen. Die Enzymaktivitäten waren so niedrig, daß sich keine regelmäßige Abhängigkeit von den Substratkonzentrationen zeigte. Auch eine Enzymaktivierung, wie bei der Zwischengruppe, war nicht zu beobachten. Dies mag ein weiteres Indiz dafür sein, daß die Zwischengruppe nicht zu den Homozygoten, sondern zur Gruppe der Heterozygoten gehört.

4. Diätbehandlung bei Histidinämie

Histidinämie ist ein relativ häufiger Stoffwechseldefekt. Es besteht kein Zweifel darüber, daß diese Stoffwechselkrankheit bei einem bestimmten Prozentsatz der Krankheitsfälle mit leichten Gehirnschäden, speziell mit einer milden Form von geistiger Retardierung, Sprachentwicklungsstörungen, Verhaltensabnormitäten und ganz selten mit Ataxie einhergeht. Bis zu welchem Alter diese Schäden auftreten ist noch nicht bekannt. Thalhammer (22) berichtete über ein Kind, dessen Mutter eine histidinarme Diät nach 6 Monaten abbrach. Mit 8 Monaten entwickelte das Kind cerebrale Bewegungsstörungen, die in den folgenden 3 Monaten, in denen eine streng histidinarme Diät eingehalten wurde, wieder verschwanden. Neville (17) entdeckte einen an Histidinämie erkrankten Jungen, bei dem zum ersten mal im Alter von 15 Jahren epileptische Anfälle auftraten. Thalhammer berichtete 1973 über 56 Histidinämiefälle (22) in insgesamt 43 Familien, die in Massenscreenings entdeckt wurden. Ungefähr 50 % dieser Patienten waren geschädigt. Tada et al. (21) hingegen konnten in insgesamt 77 untersuchten Fällen keine auffallenden Krankheitszeichen finden. Lediglich bei einem 4-jährigen Kind war die Sprachentwicklung etwas verzögert; ein zweites Kind hatte einen IQ von 84.

Bis jetzt konnten keine biochemischen Unterschiede zwischen Histidinämiepatienten mit Krankheitserscheinungen und solchen, die symptomlos waren, gefunden werden. Da jedoch die oben beschriebenen Auffälligkeiten immer wieder im Zusammenhang mit Histidinämie beschrieben wurden, stellt sich die Frage, ob eine histidinarme Diät diese Krankheitszeichen verhindern kann. Es bestehen noch unterschiedliche Ansichten darüber, ob und in welchem Ausmaß dies möglich ist (7,12,15,17,18).

Da es aber sehr wahrscheinlich ist, daß eine erhöhte Serumhistidinkonzentration auf direktem oder indirektem Wege zu den

oben beschriebenen Erscheinungen führt (die Wahrscheinlichkeit einer geistigen Retardierung oder sprachlichen Zurückgebliebenheit ist nach Kuroda et al. (9) bei Histidinämiepatienten 10 mal höher als bei der Normalbevölkerung), müßte es logischerweise auch möglich sein, die klinischen Erscheinungen bei Histidinämiepatienten durch eine histidinarme Diät und einen dadurch niedrigen Serumhistidinspiegel zu verringern.

Tada et al. (21) stellten fest, daß die Histidinblutspiegel bei unbehandelten Histidinämiepatienten ohne geistige Retardierung zwischen 4 mg/dl und 16 mg/dl variierten. Bei einigen weiteren Patienten fand er wesentlich höhere Histidinblutspiegel. Er schlug deshalb eine histidinarme Diät während der frühen Kindheit (die Zeit, in der das Gehirn sich entwickelt) ab Histidinblutspiegeln von 15 mg/dl vor.

Thalhammer (22) behandelte alle Histidinämiepatienten, bei denen die Histidinblutwerte über 8 mg/dl lagen. Wie schon erwähnt, entwickelte ein Kind nach Abbruch der Diät cerebrale Bewegungsstörungen, die nach erneuter Diät wieder verschwanden, ein Zeichen dafür, daß eine histidinarme Diät durchaus erfolgversprechend ist. Alle anderen behandelten Patienten boten keine Symptome. Da jedoch der Älteste davon erst 9 Jahre alt ist, sind weitere Langzeitbeobachtungen nötig, um die Notwendigkeit einer Diät bei Histidinämie noch besser beurteilen zu können.

VI. Inhaltsangabe

Histidinämie ist eine Stoffwechselkrankheit, bei der das Enzym Histidase teilweise bis vollständig fehlt. Die Histidaseaktivität lässt sich leicht in der Eponychialhaut bestimmen (Methode von Wegele (24) und Shin et al. (19). Aus dem "Department für Neonatologie und angeborene Störungen" in Wien erhielten wir Proben von insgesamt 25 Patienten und deren Angehörigen, in denen die Histidaseaktivität bestimmt wurde. Die Histidaseaktivitäten von Patienten, Eltern, Geschwistern und Gesunden ließen sich folgendermaßen unterteilen:

<u>Gruppe I:</u> Patienten	n	Enzymaktivität	
		$\mu\text{mol/h/gProtein}$	$\mu\text{mol/h/gGewebe}$
Homozygote	20	$1,4895 \pm 0,87^1$ $0,04-2,8^2$	$0,1768 \pm 0,1237$ $0,003-0,38$
"Heterozygoten- Zwischengruppe"	5	$6,656 \pm 1,328$ $5,4-8,9$	$0,498 \pm 0,155$ $0,37-0,72$

¹Mittelwert $\pm$ Standardabweichung; ²Bereich;

<u>Gruppe II:</u> Eltern	n	Enzymaktivität	
		$\mu\text{mol/h/gProtein}$	$\mu\text{mol/h/gGewebe}$
Homozygote	10	$1,962 \pm 0,642$ $0,64-2,6$	$0,1473 \pm 0,094$ $0,003-0,34$
"Heterozygoten- Zwischengruppe"	15	$5,235 \pm 1,2338$ $2,83-7,3$	$0,413 \pm 0,1404$ $0,26-0,78$
Heterozygote	20	$16,808 \pm 4,654$ $8,93-25,9$	$1,528 \pm 0,739$ $0,66-2,4$

<u>Gruppe III:</u>	n	Enzymaktivität	
		mol/h/gProtein	mol/h/gGewebe
Geschwister			
Homozygote	7	1,63 $\pm$ 0,915 0,03-2,7	0,1233 $\pm$ 0,075 0,003-0,22
"Heterozygoten- Zwischengruppe"	7	5,651 $\pm$ 0,975 3,96-6,81	0,505 $\pm$ 0,1142 0,33-0,67
Heterozygote	1	15,1 15,1	0,75 0,75
<u>Gruppe IV:</u>			
Gesunde			
	20	52,3 $\pm$ 15,5 27,0-83,0	5,04 $\pm$ 1,89 2,20-8,56

Bei der Zwischengruppe, deren Aktivitäten zwischen Homozygoten und Heterozygoten lagen, und die hauptsächlich aus Eltern und Geschwistern von Patienten bestand, handelt es sich wahrscheinlich auch um Heterozygote.

Von den untersuchten Familien wurden Stammbäume angefertigt und der autosomal-rezessive Erbgang der Histidinämie auf diese Weise graphisch dargestellt.

Zwischen den Serumhistidinspiegeln und den Histidaseaktivitäten bei Patienten bestand keine Korrelation.

Bei der anschließenden Studie zur Enzymkinetik ergaben sich im Lineweaver-Burk-Diagramm für Gesunde und Heterozygote jeweils Geraden. Die K_m -Werte lagen für Gesunde zwischen 1,0 mMol/L und 1,5 mMol/L, für Heterozygote waren sie etwas höher (bis

3,0 mMol/L). Für die Zwischengruppe ergaben sich im Lineweaver-Burk-Diagramm nicht-lineare, hyperbolische Kurven, die wahrscheinlich durch eine Substrataktivierung zustande kamen. Für die Homozygoten erhielt man unregelmäßig geschwungene Kurven, deren Werte für $\frac{1}{v}$ teilweise im Unendlichen lagen und deren K_m - und v_{max} -Werte nicht zu bestimmen waren.

Literaturverzeichnis

1. Auerbach, V.H., Di George, A.M., Baldrige, R.C., Tourtelotte, R.C. and Brigham, M-B.: Histidinämia: A deficiency in histidase resulting in the urinary excretion of histidine and of imidazole pyruvic acid, *J. Pediatr.*, 60 487 (1962)
2. Buehring, K.U., Batra, K.K. and Stokstad, E.L.R.: The effect of methionine on folic acid and histidine metabolism in perfused rat liver. *Biochem. et Biophys. acta* 279, 498-512 (1972)
3. Kacser, H., Bulfield, G. and Wright, A.: The biochemistry and genetics of histidinemia in the mouse. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 33-41 (1979)
4. Kacser, H., Mya, K.M. and Bulfield, G.: Endogenous teratogenesis in maternal histidinemia. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 43-53 (1979)
5. Kamoun, P.P., Parvy, P. and Cathelineau, L.: Renal Histidinuria. *J. Inher. Metab. Dis.* 4, 217-219 (1981)
6. Karlson, P.: Stoffwechsel der Proteine; Enzymkinetik. Kurzes Lehrbuch der Biochemie 157-158, 70-73 (1977) Thieme Verlag Stuttgart
7. Komrower, G.M. and Sardharwalla, I.B. Histidinemia: To treat or not to treat ? *Lancet* 1, 1047 (1974)
8. Kuroda, Y., Ito, M., Ogawa, T., Takeda, E. Toshima, K. and Miyao, M.: A new sensitive method for assay of histidase in human skin and detection of heterozygotes for histidinemia. *Clin. Chim. Acta.* 96, 139-144 (1979)

9. Kuroda, Y., Ogawa, T., Ito, M., Watanabe, T., Takeda, E., Toshima, K. and Miyao, M.: Relationship between skin histidase activity and histidine response to histidine intake in patients with Histidinemia. *Brief Clin. Lab. Observ.* 97, 269-272 (1980)

10. Kuroda, Y., Watanabe, T., Ito, M., Toshima, K. and Miyao, M.: Altered kinetic properties of skin histidase in two patients with histidinemia. *J. Inher. Metab. Dis.* 5, 73-74 (1982)

11. La Du, B.N., Howell, R.R., Jacoby, G.A., Seegmiller, J.E. and Zannoni, V.G.: The enzymatic defect in histidinemia. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 7, 398 (1962)

12. Lee, N.S., Fitzpatrick, D., Meier, E. and Fisher, H.: Influence of dietary Histidine on Tissue Histamine concentration, Histidine decarboxylase and histamine methyltransferase activity in the rat. *Agents and Actions*, vol. 11, 4, 307-311 (1981)

13. Leuthardt, F.: "Intermediärstoffwechsel" 640-643 (1977)
de Gruyter-Verlag Berlin-New York 1. Auflage

14. Lyon, I.C.T., Gardner R.J.M. and Veale A.M.O.: Maternal Histidinemia, *Arch. Dis. Child* 46: 581 (1974)

15. Lyon, I.C.T. and Veale, A.M.O. Histidinemia: To treat or not to treat. *Lancet*, 1, 1047 (1974)

16. Meister, A.: "Biochemistry of the Aminoacids" 818-841 (1965) Academic Press, New York-London, 2. Edition

17. Neville, B.G.R., Bentovim, A., Clayton, B.E. and Shepard, J.: Histidinemia. Study of relation between clinical and biological findings in seven subjects. Arch. dis. Child 47, 190 (1972)
18. Popkin, J.S., Clow, C.L., Scriver, C.R. and Grover, J.: Is hereditaria Histidinemia harmful ? Lancet 1, 721 (1974)
19. Shin, Y., Scheibenreiter, S., Wegele, G., Mally, E. and Endres, W.: A simple method for histidase assay and an alteration in the affinity of skin histidase for histidine in histidinemia. J. Inher. Metab. Dis. 6 Suppl. 2 (1983)
20. Tabor, H. and Mahler, A.H.: Histidase and Urocanase. In Colowick, S.P. and Kaplan, N.O. (eds), Methods in Enzymology, Academic Press, New York and London, Vol. 2, 228-233 (1955)
21. Tada, K., Tateda, H., Arashima, Sch., Sakai, K., Kitagawa, T., Aoki, K., Suwa, S., Kawamura, M., Oura, T., Takesada, M., Kuroda, Y., Yamashita, F., Matsuda, I. und Naruse, H.: Intellectual development in Patients with untreated Histidinemia. Journal of Paediatrics, Vol. 101, No. 4, pp. 562-563 (1982)
22. Thalhammer, O.: Neonatal Screening for Histidinemia. Inborn Errors of Metabolism, Hrsg.: H. Bickel, R. Guthrie, G. Hammersen; 59-65 (1980) Springer-Verlag.
23. Watanabe, T., Kitamura, Y., Maeyama, K., Go, S., Yamatodani, A., Wada, H.: Absence of increase of Histidine decarboxylase activity in mast-cell-deficient W/W mouse embryos before parturition. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1981), Vol. 78, No. 7, pp. 4209-4212

24. Wegele, G.: Eine einfache radiometrische Histidase-Messmethode für Leber- und Eponychialgewebe. Dissertationsarbeit; Ludwig-Maximilians-Universität München (1984).
25. Woody, N.C., Snyder, H. and Harris, J.A.: Histidinemia, Am. J. Dis. Child 110:606 (1965)
26. Wright, A.F., Bulfield, G., Arfin, S.F. and Kacser, H.: Comparison of the Properties of Histidine Ammonia-Lyase in Normal and Histidinemic Mutant Mice. Biochemical Genetics, Vol. 20, Nos. 3/4 (1982)
27. Zannoni, V.G. and La Du, B.N.: Determination of Histidine α -Deaminase in Human Stratum Corneum and its Absence in Histidinemia. Biochem. J., 88, 160-163 (1963)

LEBENS LAUF

- 1958 geboren am 15.09. in Neumarkt/Opf. als Tochter des praktischen Tierarztes Dr. Franz Mally und seiner Ehefrau Josefa, geborene Perras.
- 1964-67 Volksschule in Velburg
- 1967 Umzug nach Viechtach
- 1968-77 Mathematisch-Naturwissenschaftliches Gymnasium in Viechtach
- 1977 Reifeprüfung am 24.06.
- 1977-78 Halbes soziales Jahr im Krankenhaus Rechts der Isar in München (September 1977 - Februar 1978)
- 1978-84 Medizinstudium an der Ludw.-Max.-Universität, München
- 1980 Ärztliche Vorprüfung am 18.03.
- 1981 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 26.03.
- 1983 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 18.03.
- 1983-84 Praktische Ausbildung der Inneren Medizin im Zentralklinikum Augsburg, der Chirurgie im Klinikum Großhadern und der Pädiatrie an der Dr. v. Haunerschen Kinderklinik München
- 1984 Abschluß des Medizinstudiums mit dem Dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 21.05.
- 1984 Assistenzärztin auf der Anästhesiologischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Deggendorf seit 1.8.

